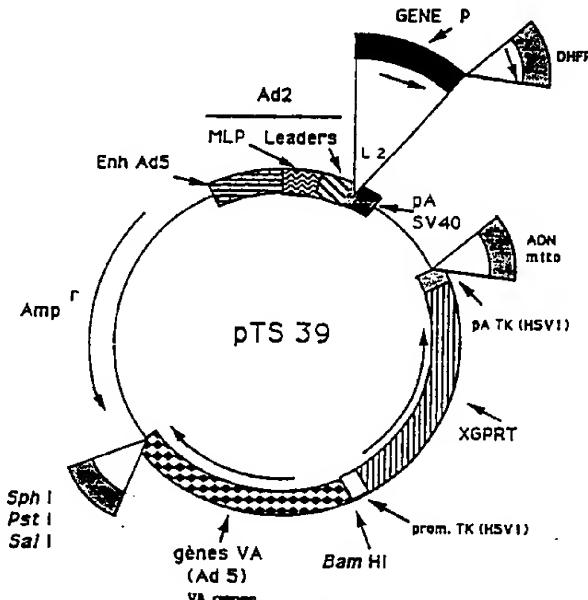




## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 5 :  C12N 15/86, 5/10, 15/24 C12N 15/27, 15/16		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 93/03163  (43) Date de publication internationale: 18 février 1993 (18.02.93)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR91/00636</p> <p>(22) Date de dépôt international: 1er août 1991 (01.08.91)</p> <p>(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): FONDATION NATIONALE DE TRANSFUSION SAN-GUINE [FR/FR]; 6, rue Alexandre-Cabanel, F-75739 Paris Cedex 15 (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): BALLAY, Annick [FR/FR]; 3, rue La Pérouse, F-78150 Le Chesnay (FR). BOFFA, Georges [FR/FR]; 62, chemin de Vauhallan, F-91120 Palaiseau (FR). CARTRON, Jean-Pierre [FR/FR]; 2, square Robiac, F-75007 Paris (FR). CHRETIEN, Stany [FR/FR]; 18, rue Gramme, F-75015 Paris (FR). LAMBIN, Patrick [FR/FR]; 54, rue des Entrepreneurs, F-75015 Paris (FR). LOPEZ, Claude [FR/FR]; 39, av. Georges-Clémenceau, F-94360 Bry-sur-Marne (FR). PRIGENT, Sylvie [FR/FR]; 9 bis, rue du Royaume, F-91440 Bures-sur-Yvette (FR). SALMON, Charles [FR/FR]; 12, rue Fabre-d'Eglantine, F-75012 Paris (FR).</p>		<p>(74) Mandataires: LEPEUDRY-GAUTHERAT, Thérèse etc. ; Cabinet Lepeudry, 6, Rue du Faubourg-Saint-Honoré, F-75008 Paris (FR).</p> <p>(81) Etats désignés: AU, BB, BG, BR, CA, CS, FI, HU, JP, KP, KR, LK, MC, MG, MN, MW, NO, PL, RO, SD, SU, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, NL, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p>	
<p>(54) Title: EXPRESSION IN NON-TUMORAL HUMAN LYMPHOBLASTOID LINES WITH AN INTEGRATIVE VECTOR</p> <p>(54) Titre: EXPRESSION DANS DES LIGNEES LYMPHOBLASTOIDES HUMAINES NON-TUMORALES AVEC UN VECTEUR INTEGRATIF</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The use of human cell lines for producing heterologous proteins, particularly therapeutically useful proteins, on an industrial scale after genetic engineering of their coding sequence and insertion into a suitable vector, is disclosed. The cell lines are non-tumoral lymphoblastoid lines which have been immortalized by EBV. The construction of an integrative-type vector plasmid comprising an expression cassette designed to promote the optimal expression of heterologous DNA sequences in lymphoblastoid cells is also disclosed.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention concerne l'utilisation de lignées cellulaires humaines pour la production, à l'échelle industrielle, de protéines hétérologues, plus particulièrement d'intérêt thérapeutique, après manipulation génétique de leur séquence codante et insertion dans un vecteur approprié. Les lignées cellulaires sont des lignées lymphoblastoides non tumorales immortalisées par l'EBV. L'invention concerne également la construction du plasmide vecteur de type intégratif comportant une cassette d'expression conçue pour favoriser l'expression optimale de séquences d'ADN hétérologue dans les cellules lymphoblastoides.</p>			



***UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION***

**Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.**

AT	Autriche	FI	Finlande	MN	Mongolie
AU	Australie	FR	France	MR	Mauritanie
BB	Barbade	GA	Gabon	MW	Malawi
BE	Belgique	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	GN	Guinée	NO	Norvège
BG	Bulgarie	GR	Grèce	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	HU	Hongrie	PL	Pologne
BR	Brésil	IE	Irlande	PT	Portugal
CA	Canada	IT	Italie	RO	Roumanie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CH	Suisse	KR	République de Corée	SE	Suède
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	République slovaque
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	SU	Union soviétique
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TD	Tchad
DE	Allemagne	MG	Madagascar	TG	Togo
DK	Danemark	ML	Mali	UA	Ukraine
ES	Espagne			US	Etats-Unis d'Amérique

Expression dans des lignées lymphoblastoides humaines  
non-tumorales avec un vecteur intégratif.

5

-----  
L'invention concerne l'utilisation de lignées cellulaires humaines pour la production, à l'échelle industrielle, de protéines hétérologues, plus particulièrement de protéines d'intérêt thérapeutique, après manipulation génétique de leur séquence codante.

Plus particulièrement, l'invention concerne l'utilisation de cellules lymphoblastoïdes humaines, immortalisées *in vitro* par le virus d'Epstein-Barr et sélectionnées pour leur absence de caractère tumoral ou tumorigène. Pour assurer l'expression de protéines hétérologues par lesdites cellules, la séquence codante de ces protéines est insérée dans un plasmide vecteur génétiquement manipulé, de type intégratif et portant une cassette d'expression conçue pour permettre l'expression desdites protéines dans les cellules lymphoblastoïdes transformées, clonées et sélectionnées, et ayant intégré la cassette d'expression dans l'ADN chromosomique cellulaire.

L'invention concerne aussi la conception et la construction de ce plasmide vecteur destiné à assurer une production optimale des protéines hétérologues par les cellules lymphoblastoïdes transformées.

La production de protéines d'intérêt thérapeutique difficiles à purifier à partir de sources naturelles où elles sont présentes en petites quantités ou dont les sources sont potentiellement dangereuses comme les tumeurs ou le plasma sanguin éventuellement contaminé par des virus, justifie encore de nombreux efforts de recherche et développement en cultures de cellules *in vitro*, dans des conditions de culture bien standardisées et offrant des garanties d'innocuité.

Cependant l'expression de molécules de grande taille et dont l'activité biologique dépend de la structure

spatiale et de la maturation correcte (glycosylation, sialylation, etc..) n'est pas possible dans n'importe quel type de cellule, en particulier dans les microorganismes, dont la fermentation industrielle est simple. Par contre 5 dans les cellules eucaryotes, si la maturation des molécules pose moins de problèmes, c'est la culture même des cellules qui pose des problèmes à l'échelle industrielle, la plupart des cellules non tumorales ne se multipliant que sous forme de monocouche, adhérant au récipient de culture. Des progrès 10 importants ont été apportés par la mise au point de techniques de culture sur microporteurs et en bioréacteurs mais elles ne conviennent pas à tous les types de cellules et posent des problèmes si les protéines ne sont pas excrétées dans le milieu de culture. D'autre part des 15 cellules comme les Vero qui sont particulièrement bien adaptées à ce mode de culture sont très réfractaires aux manipulations génétiques.

La recherche de nouvelles lignées cellulaires et de vecteurs adaptés pour permettre la manipulation génétique 20 de celles-ci justifie donc toujours d'importants efforts de recherche.

C'est pourquoi la Demandante a envisagé l'utilisation de lignées lymphoblastoïdes humaines semblables à celles qu'on utilise déjà pour la production 25 d'anticorps monoclonaux mais cette utilisation nécessite la mise au point de vecteurs de clonage et d'expression particulièrement adaptés à ces cellules.

Une lignée lymphoblastoïde humaine, la lignée Namalwa, a déjà été utilisée pour produire une protéine 30 hétérologue ; elle se multiplie bien en suspension et sécrète la protéine hétérologue dans le milieu où on peut la récupérer, sous forme biologiquement active (Yanagi et al. Gene 1989, 76, 19 et DNA 1989, 8, 419) mais cette lignée est dérivée d'un lymphome de Burkitt et présente un haut degré 35 de tumorigénérité.

C'est pourquoi l'objectif de la présente invention est l'utilisation de cellules lymphoblastoïdes humaines non

tumorales et non tumorigènes.

De telles cellules sont connues : par transformation avec le virus d'Epstein-Barr (EBV) on peut immortaliser des lymphocytes B du sang d'un donneur sain 5 quelconque, et sélectionner des lignées qui ne synthétisent que l'antigène nucléaire EBNA-1 de l'EBV (Thoda et al. Cancer Res. 38, 1978, 3560). De telles lignées prolifèrent de manière indéfinie en culture mais ne sont pas tumorales, ce qu'on vérifie par leur absence de capacité de former des 10 colonies en agar, et elles ne sont pas tumorigènes sur la souris "nu-nu" (Gurtsevitch et al, Int J. Cancer 47, 87, 1988, Tursz, Medecine/Sciences 6, Suppl.42, 1989).

La Demanderesse utilise déjà des lignées de ce type pour produire des anticorps monoclonaux. Un milieu de 15 culture pauvre en protéines a été mis au point pour faciliter la purification des molécules sécrétées (brevet F 2 600 076).

Ce type de cellule a déjà servi de modèle pour exprimer des protéines hétérologues dont le gène est inséré 20 dans un réplicon autonome qui se maintient à l'état épisomique dans la cellule parce qu'il porte l'origine de réPLICATION de l'EBV qui se retrouve sous le contrôle de la protéine EBNA-1 de l'EBV qui a servi à immortaliser la lignée cellulaire (Kioussis et al. EMBO J.6, 1987, 355 ; 25 Young et al. Gene 62, 1988, 171 ; Jalanko et al. Gene 78, 1989, 287). Toutefois, l'état épisomique du réplicon ne permet pas de garantir la stabilité de son nombre de copies par cellule et donc la capacité de production de la protéine hétérologue au cours du temps, surtout à une échelle 30 industrielle qui implique un très grand nombre de cycles de multiplication cellulaire.

C'est pourquoi la présente invention concerne également la mise au point, par manipulation génétique, d'un vecteur comportant tous les éléments nécessaires à 35 l'expression d'une protéine hétérologue dans les cellules lymphoblastoïdes humaines mais également des éléments d'ADN favorisant l'intégration de cet ensemble dans l'ADN

chromosomique de la cellule réceptrice.

Ainsi la présente invention concerne l'utilisation de lignées de cellules lymphoblastoïdes humaines, immortalisées *in vitro* par l'EBV et sélectionnées pour leur absence de caractère tumoral ou tumorigène, lesdites cellules pouvant être dérivées des lymphocytes B d'un donneur sain quelconque ou, parmi de telles lignées, on peut choisir une lignée particulière et bien caractérisée, déposée à l'ATCC sous la référence CCL 156 RPMI 1788.

L'utilisation selon l'invention permet la production, à l'échelle industrielle, de protéines hétérologues codées par un segment d'ADN adapté pour être inséré dans un plasmide vecteur génétiquement manipulé, de type intégratif et portant une cassette d'expression comprenant tous les éléments permettant l'expression desdites protéines hétérologues après intégration de ladite cassette d'expression dans l'ADN chromosomique des cellules lymphoblastoïdes.

La présente invention concerne également la conception et la construction du plasmide vecteur destiné à l'utilisation des cellules lymphoblastoïdes pour la production de protéines hétérologues. Ledit plasmide comprend, outre les éléments d'ADN bactérien nécessaires à son amplification dans un hôte de type E.Coli et qui dérivent du plasmide de départ pMLP10 (Ballav et al. Hepadna Viruses, 1987, 481 Ed. Alan R. Liss),

- les éléments qui constituent une cassette d'expression permettant l'insertion d'un ADN hétérologue quelconque en vue de son expression dans les cellules lymphoblastoïdes humaines,

- la séquence d'ADN de l'Adenovirus 5 codant pour les ARN VA I et VA II pour optimaliser la traduction des ARN messagers (Mathews, Cell 6, 223, 1975 ; Soderland et al, Cell 1, 585, 1976 ; Schneider et al, Cell 37, 291, 1984, Svensson et al. EMBO J. 4, 957, 1985) ;

- le plasmide comprend en outre un gène de sélection manipulé pour être efficace dans les cellules eucaryotes :

on peut choisir l'ADN codant pour la xanthine-guanine phosphoribosyl transférase (XGPRT) de E.coli placé sous le contrôle du promoteur et des signaux de maturation du gène TK du virus Herpes simplex 1 (HSV1) (Mulligan Berg. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 2072, 1981) ; on peut également choisir l'ADNc de la dihydrofolate réductase de souris (DHFR) qui permet une amplification génique en présence de méthotrexate (Alt et al, J. Biol. Chem. 253, 1357, 1978)

on peut aussi envisager l'utilisation simultanée des deux gènes de sélection, insérés à des points distincts du plasmide vecteur.

- le plasmide vecteur comprend également des éléments d'ADN sélectionnés pour favoriser l'intégration de l'ADN plasmidique dans l'ADN chromosomique de la cellule lymphoblastoïde. Ces éléments d'ADN seront plus particulièrement choisis parmi les fragments d'ADN mitochondrial de souris qui ont été décrits comme favorisant la multimérisation en tandem d'ADN hétérologue au cours de l'intégration dans le génome de cellules de mammifères (Lutfalla et al. Somatic cell and Mol. Genetics, 11, 223, 1985).

La cassette d'expression comprend un ensemble d'éléments constituant une unité de transcription fonctionnelle dans les cellules choisies et plus particulièrement :

- en amont de la position qui recevra la séquence d'ADN hétérologue, des éléments de régulation d'Adenovirus humains comprenant une séquence activatrice, un promoteur et une séquence "leader",

- et, en aval de cette position, un signal de polyadénylation dérivé du virus SV 40.

Les éléments dérivés d'Adenovirus humains sont de préférence :

- le promoteur de l'Adenovirus 5 (Lavery et al. J. Virol. 61, 14666, 1987) placé sous le contrôle d'une séquence activatrice de la transcription, située en amont du promoteur, et de préférence la séquence activatrice E1A de

l'Adenovirus 5,

- le promoteur majeur tardif (MLP) de l'Adenovirus 2 couplé à une copie ADNc de la séquence "leader" tripartite de l'Adenovirus 2, ce qui permet une augmentation de 5 l'efficacité de la traduction des ARN messagers. Ces divers éléments indépendants sont décrits par Berkner (Biotechniques 6, 616, 1988).  
Ce choix n'est pas limitatif : d'autres éléments dérivés d'Adenovirus peuvent aussi être utilisés comme le promoteur 10 majeur tardif de l'Adenovirus 5 et les "enhancers" du BKV (Grinnell et al, Mol Cell. Biol. 6, 3596-3605, 1986) ou du SV40 (Zenke et al, EMBO J. 5, 387-397, 1986), et en particulier de leur association en tandem (Berg et al., Nucl. Acid. Res, 16, 1635, 1988).

15 La zone centrale de la cassette d'expression, destinée à l'insertion de la séquence d'ADN hétérologue a été conçue pour offrir des sites de restriction rares pour favoriser cette manipulation d'insertion, et plus particulièrement, les sites Not I, Bst E II, Bgl II, Mlu I.

20 L'invention est plus particulièrement destinée à l'utilisation des cellules décrites, avec le plasmide vecteur décrit, pour produire des protéines d'intérêt thérapeutique difficiles à purifier à partir de sources naturelles. L'invention comprend donc l'insertion des ADN 25 codant pour ces protéines hétérologues dans la cassette d'expression telle que décrite plus haut. Le plasmide vecteur est ensuite introduit dans les cellules par électroporation (Potter et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 7161, 1984).

30 Comme premier ADN utilisé à titre de modèle pour prouver la faisabilité technique des productions proposées, on a utilisé l'ADN de l'érythropoïétine humaine (qui sera notée Epo ou Epo HR pour erythropoïétine humaine recombinante). On peut aussi utiliser un ADN d'une protéine 35 analogue présentant l'activité de l'érythropoïétine.

La protéine naturelle est produite dans les reins et circule en très faible quantité dans le plasma. Elle joue

un rôle essentiel dans la maturation des érythrocytes.

Elle comprend 166 acides aminés et de 40 à 50 % de glucides ce qui impose sa synthèse dans des cellules appropriées. Son extraction à partir d'urine de patients 5 aplasiques (Mikake et al. J. Biol. Chem. 252 5558, 1977) et à partir de tumeurs rénales (Sherwood et al. Endocrinology 99, 504, 1976) sont décrites mais ne permettent pas une production industrielle.

La production d'Epo humaine recombinante a 10 également été décrite dans divers types de cellules (COS, CHO, BHK, NIH 3T3) mais les inconvénients de ces différentes cellules ont déjà été évoqués plus haut.

Un deuxième modèle a été mis au point avec la séquence codante de l'interleukine 3 (IL-3).

15 L'IL-3 est une glycoprotéine de 20-26 kDa stimulant la prolifération et la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques appartenant aux lignées érythroïdes, mégacaryocytaires, granulo-macrophagiques, éosinophiles et basophiles, dont l'ADNc humain a été cloné 20 par Yang et al (Cell 47, 3-10, 1986). Chez la souris, l'IL-3 est impliquée dans l'autorenouvellement et la différenciation de la cellule souche multipotente (CFU-S), en synergie avec l'IL-1. L'IL-3 possède également, en 25 synergie avec les cytokines spécifiques de chaque lignée, une activité sur la croissance et les fonctions de cellules différenciées (macrophages et mastocytes, polynucléaires neutrophiles et éosinophiles). A cause de son rôle dans la stimulation des cellules souches hématopoïétiques, l'IL-3 pourrait trouver une application thérapeutique dans le 30 traitement des aplasies médullaires (Shrader, Annu. Rev. Immunol. 4, 205-230, 1986 ; Mizel, FASEB J. 3, 2379, 1989 ; Tigaud et al., medecine/sciences 7, 444, 1991). Il a été montré aussi que l'IL-3 stimule l'hématopoïèse chez les primates, en synergie avec le GM-CSF (Donahue et al., 35 Science 241, 1820, 1988).

Un troisième modèle a été mis au point avec la séquence codante du GM-CSF (granulocyte-macrophage colony

stimulating factor). Le GM-CSF est aussi une multipotente, c'est-à-dire un facteur de croissance capable, comme l'IL-3, de stimuler la croissance et la différenciation de plusieurs lignées hématopoïétiques (granulo-monocytaires, érythroïdes et colonies mixtes) et d'agir sur les fonctions des cellules différencierées (macrophages). Le gène humain du GM-CSF a été cloné par plusieurs équipes (Wong et al, Science 228, 810, 1985 ; Lee et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 4360, 1985 ; Cantrell et al, Proc. Natl Acad. Sci USA 82, 6250, 1985 ; 10 Miyatake et al, EMBO J. 4, 2561, 1985) et cette molécule fait l'objet d'études de développement clinique chez l'homme dans le traitement des aplasies médullaires, des leucopénies d'origine virale (EBV, HIV) et le traitement des cytopénies induites par les chimiothérapies anti-néoplasiques (Clark et 15 Kamen, Science 236, 1229, 1987 ; Groopman et al, N. Engl. J. Med. 321, 1449, 1989 ; Applebaum et al, Sem. Hematol. 26, 7, 1989 ; Solal-Céliney, médecine/Sciences 4, 231, 1991 ; Tigaud et al., médecine/sciences 7, 444, 1991).

La présente invention couvre également les lignées cellulaires après leur transformation stable par un plasmide vecteur tel que décrit et qui ont été clonées et sélectionnées par criblage, parmi de nombreux clones transformés, pour leur taux élevé de sécrétion de la protéine hétérologue choisie. Les procédés de récolte et de 25 purification sont adaptés à chacune des protéines.

Les exemples suivants sont destinés à illustrer l'invention sans toutefois en limiter la portée.

Les 2 figures suivantes permettent de mieux comprendre les constructions génétiques :

30 Figure 1 : Schéma de la construction du vecteur pTS39. Toutes les constructions dérivent du plasmide pMLP10. Les abréviations suivantes sont utilisées pour désigner les différents fragments d'ADN : E : séquence activatrice du gène E1A d'Ad5 ; MLP : promoteur majeur tardif d'Ad2 ; L : copie ADNc de la séquence leader tripartite d'Ad2 ; CAT : 35 gène bactérien codant pour la chloramphénicol acétyl transférase ; II : polylinker du pUC18 ; L2 :

oligonucléotide de synthèse ; P : région codante de la protéine hétérologue ; pA : signal de polyadénylation du virus SV40 ; XGPRT : gène bactérien codant pour la xanthine guanine phosphoryosyl transférase ; VA : gènes d'Ad5 codant pour les ARN VA ; mito : fragment d'ADN murin d'origine mitochondriale ; DHFR : ADNc murin codant pour la dihydrofolate reductase.

- Figure 2 : Schéma du vecteur d'expression de type intégratif pTS39.
- 10 ADN mito : fragment d'ADN murin d'origine mitochondriale. Un second gène de sélection (DHFR) est placé en position bicistronique en aval de la région codante P.  
Autres abréviations : comme figure 1.

15 Exemple 1 : construction du vecteur intégratif

Le vecteur intégratif pTS39 représenté sur la figure 2 a été construit par les étapes successives suivantes, schématisées dans la figure 1.

- Le plasmide de départ est le pMLP10 (Ballay et al. Hepadna Viruses, 481, 1987, Ed. Alan R. Liss).
- Le plasmide pMLPCAT dérive du pMLP10 par insertion du fragment HindIII-BamHI du pHp34-CAT contenant le gène CAT et les signaux de maturation de SV40 (P. Gilardi et al, Nucleic Acid Research 20. 7877-7887, 1984) entre les sites HindIII et BamHI du pMLP10.
- Le plasmide pTS1 a ensuite été obtenu par insertion du polynker EcoRI-HindIII de pUC18 au niveau du site NruI du pMLPCAT.
- Le plasmide pTS2 dérive du pTS1 par insertion de l'oligonucléotide de synthèse suivant (noté L<sub>2</sub> dans les schémas) :  
-AGCTTGGCCGCCGGTTACCAAGATCTACGCGTGTT-3'  
-ACGCCGGCGCCAATGGTCTAGATGCGCACAA-5'  
contenant les sites rares NotI, SacII, BstEII, BalII, MluI entre les sites HindIII-HpaI du pTS1, et où sera insérée la séquence codante de la protéine hétérologue choisie (notée P).

10

- Le plasmide pTS5 est ensuite obtenu en insérant le fragment HindIII du pAG60VA (contenant les gènes VAI et VAI<sup>I</sup> d'Ad5) au niveau du site XbaI du pTS2.
- Le plasmide pTS17 dérive du pTS5 par insertion du fragment 5 PvuII de pAGT40 (contenant le gène XGPRT sous le contrôle du promoteur et des signaux de maturation du gène Tk du virus HSV1) au niveau du site SmaI de pTS5.
- Le plasmide pTS37 dérive de pTS17 par insertion du fragment 10 EcoRI-PvuI du p $\delta$ 1 contenant séquence d'ADN mitochondrial de souris au niveau du site SacI du pTS17.
- Enfin, le plasmide pTS39 est obtenu en insérant le fragment BamH1-BglII du pTG1086 (contenant la région codante du cDNA DHFR murin, qui constitue un moyen de pression sélective alternatif au XGPRT) au niveau du site BglII de 15 pTS37, pour être placé en position bicistronique par rapport à la séquence codante P insérée dans l'oligonucléotide L<sub>2</sub>.
- Le plasmide pTS39 sera noté pTS39-P quand la séquence codante d'une protéine hétérologue sera insérée dans l'oligonucléotide L<sub>2</sub> (et donc noté L<sub>2</sub>-P sur le schéma).

20

Exemple 2 : Utilisation du plasmide pTS39 pour produire l'érythropoïétine humaine dans les cellules lymphoblastoïdes

2.1. Isolement du gène de l'Epo

25 Une banque d'ADN génomique a été criblée avec un oligonucléotide 30-mer: 5'-CGTGATATTCTGGCCTCCCTGGCCTCCAA-3' déduit de la séquence du gène (Lin et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7580, 1985). Cette sonde est complémentaire inversée de l'ARN messager et elle reconnaît la séquence de 30 l'Epo en position 129-159 (la base No 1 représentant l'initiation de la traduction).

Le vecteur de clonage est EMBL 3, il contient des fragments insérés d'ADN humain de 12 à 20 kb. On étale  $10^7$  clones répartis sur 10 boîtes de 15 cm de diamètre. Trois séries de filtres, répliques de ces boîtes, ont été lavées 35 et hybridées avec les sondes oligonucléotidiques marquées à l'aide de la T4 polynucléotide kinase, et présentant une

11

activité spécifique de  $10^9$  cpm/ $\mu$ g, dans les conditions suivantes :

- Pré-hybridation : 3 SSC, 2 X Denhardt's, 0,005 % Tétr sodium disphosphate (Nappi), 100  $\mu$ g/ml sperme de saumon, 5 52°C pendant 4 h.
- Hybridation : 6 SSC, 2 X Denhardt's, 0,05 % Nappi, 20  $\mu$ g/ml tARN, 55°C pendant la nuit avec la sonde Epo ( $10^6$  cpm/ml par filtre).
- Lavage : 2XSSC, température laboratoire, 2 X SSC, 0,005 % Nappi, 3 x 20 min. à 52°C.
- Lavage supplémentaire en 1 X SSC, 0,05 % Nappi à 52°C pendant 20 min et/ou 0,1 SSC, 0,05 % Nappi à 52°C pendant 20min.

Quatre criblages successifs ont été réalisés pour 15 aboutir à la caractérisation de 3 clones purs hybridant très fortement avec la sonde.

L'ADN de ces 3 phages a été amplifié, puis analysé. Afin de contrôler la présence du gène Epo dans son intégralité, la carte de restriction de ces 3 clones a été 20 construite et la présence des extrémités 3' et 5' du gène Epo a été recherchée en utilisant deux sondes oligonucléotidiques reconnaissant les bornes de ce gène. Deux clones parmi les trois contenaient le gène Epo dans son intégralité. Des fragments de restriction contenant le gène 25 Epo dans son intégralité ont été sous clonés dans un vecteur d'amplification du type pUC. Ainsi les deux fragments de restriction BamHI-HindIII de 5,4 kb et BglII-BglII de 4 kb ont été sous clonés.

30 2.2. Isolement de l'ADNc humain de l'Epo

Les ARN totaux d'une tumeur rénale humaine exprimant de façon constitutive l'Epo ont été isolés. A partir de ces ARN totaux la fraction ARN poly A+ a été isolée par passage sur colonne d'oligo-dT et clonée par la 35 méthode PCR.

Deux sondes encadrant l'ADNc de l'Epo ont été choisies :

12

. INTS 10 : 5'-CTGGAGTGTCCATGGGACAG-3'

Cet oligonucléotide (20-mer) est en position 694 par rapport à l'adénosine 1 de l'ATG (initiation de la traduction du messager Epo). Cet oligonucléotide reconnaît la séquence inverse complémentaire de l'ARNm de l'Epo et borne la partie 5' de l'ADNc.

. INTS 9 : 5'-AGGCAGGGAGATGGGGTGC-3'

Cet oligonucléotide (20-mer) est dans le même sens que l'ARNm et borne la partie 5' de l'ADNc de l'Epo (position-10 par rapport à l'adénosine 1 du codon d'initiation). La sonde INTS 10 permet de recopier la matrice ARNm de l'Epo en utilisant la reverse transcriptase. L'ARNm est ensuite dégradé à la soude pendant 1 heure à 65°C. Cet ADNc simple brin peut-être alors amplifié par la technique PCR en utilisant les deux sondes bornant l'ADNc : INTS 10 et INTS 9. Un fragment d'ADN de 723 pb a été ainsi amplifié puis isolé par électrophorèse, cloné dans un vecteur d'amplification du type pUC puis séquencé.

20 2.3. Introduction des séquences codantes de l'Epo dans le vecteur pTS39

La séquence codante de l'Epo (génomique ou ADNc) est introduite dans l'oligonucléotide ( $L_2$ ) du plasmide pTS39 sous forme de fragment EstEII-BglII entre les sites HindIII 25 et BglII.

Les constructions résultantes seront appelées pTS39-Epo.

30 2.4. Transfection des cellules et sélection des transformants

La transfection est réalisée avec un électropulsateur ATEIM (Bioblock, France). Deux solutions acqueuses sont préparées préalablement :

- . Le milieu de fusion : Inositol 250 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, Mg Acétate 0,5 mM, Ca Acétate 0,1 mM ; pH 7,4.
- 35 . Le milieu post-fusion : NaCl 132 mM, KCl 8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1mM, Mg Acétate 0,1 mM, Ca Acétate 0,1 mM ; pH 7,4.

Après 2 jours de culture, les cellules sont lavées et ajustées à  $4.10^7$ /ml dans le milieu de fusion. La suspension est incubée 10 min à 0°C en présence de l'ADN à transfacter ( $5\mu\text{g}/10^6$  cellules). Un échantillon de la suspension est placé entre les électrodes de l'appareil et l'électroporation est conduite dans les conditions suivantes: 4 impulsions rectangulaires à 1 seconde d'intervalle de durée 100  $\mu\text{s}$ , avec un champ électrique de 1.500 V/cm<sup>2</sup>. Immédiatement après le choc électrique la suspension est diluée au 1/20 puis incubée 20 min à 37°C. La viabilité des cellules se situe entre 20 et 60 %. Les cellules sont ensuite mises en culture à une concentration de  $0,5 \cdot 10^6$  cellules/ml.

48 heures après la transfection un aliquot du surnageant est prélevé pour le dosage de l'Epo. Les cellules sont alors cultivées en milieu sélectif (Iscove, 10 % SVF - sérum de veau foetal - dialysé, acide mycophénolique 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , xanthine 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  correspondant au gène de sélection XGPRT).

Après 14 à 21 jours de sélection sur le pool, des clonages par dilution limite sont réalisés en microplaques de 96 puits en présence de cellules nourricières (lymphocytes humains totaux, irradiés à 4000 rds, issus de donneurs sains).

25

#### 2.5. Production d'Epo HR par les cellules transformées

\*Cellules ATCC CCL156 transformés par le vecteur d'expression pTS39-Epo.

Environ  $6.10^6$  cellules CCL156 sont transfectées par électroporation avec 30  $\mu\text{g}$  d'ADN plasmidique puis soumises 48 h après transfection, au milieu sélectif contenant la xanthine et l'acide mycophénolique. La population résistante est clonée par dilution limite en présence de cellules nourricières (lymphocytes humains irradiés). Parmi les différents clones obtenus, le clone 156 0,5AF8 secrète environ 100 à 150 unités d'Epo par ml de milieu de culture/72 h et a été suivi à long terme en

présence et en absence de pression de sélection. Les résultats indiquent que ce clone est stable sur 48 passages soit environ 7 mois de culture en absence de pression de sélection.

5 L'analyse en Southern blot de l'ADN total extrait du clone 156 0.5AF8 indique que le vecteur pTS39-Epo est intégré en tandem dans le génome cellulaire à raison de 15 à 20 copies par cellule, que le clone soit cultivé en présence ou en l'absence de pression de sélection.

10 En culture en "roller", le clone 0.5AF8 secrète 80 à 100 U Epo/ml en trois jours de culture en milieu pauvre en protéines CK4 ou CK4N (milieu de base : mélange Iscove-Ham F12 (1:1) ; CK4 : suppléments : albumine humaine 50 mg/l, transferrine humaine (saturée à 30 % par adjonction de 15 FeCl<sub>3</sub>) 1 mg/l, insuline bovine 3 mg/l, acide linoléique 1 mg/l, putrescine 10 μM, éthanolamine 20 μM ; CK4N, idem plus ribonucléotides : Adénosine 100 mg/l, Cytidine 100 mg/l, Guanosine 100 mg/l, Uridine 100 mg/l). Ce taux de sécrétion peut être renouvelé 3 fois si le milieu est changé tous les 20 3 jours.

\*Cellules immortalisées in vitro par l'EBV (lignée INTS-F5).

L'expérience réalisée sur les cellules CCL156 a été reproduite sur des cellules F5, déjà utilisées au 25 laboratoire pour la production d'anticorps monoclonaux (Goosens et al. J. Immunol. Methods 1987, 101, 193) et qui sont transfectées avec le vecteur pTS39-Epo. Les dosages d'Epo effectués à différents temps après la transfection sont positifs : on détecte 29 U Epo/ml/10<sup>6</sup> cellules après 21 30 jours de sélection.

#### 2.6. Détection de l'activité biologique et immunologique de l'Epo HR

\*Culture d'érythroblastes de foie foetal.

35 L'activité de l'Epo est mesurée in vitro d'après l'incorporation de <sup>59</sup>Fe par les érythroblastes de foie foetal de souris (prélevés au 13<sup>e</sup> jour de gestation)

cultivés en 26 heures selon une méthode dérivée de celle décrite par Stephenson et al, (Endocrinology 88, 1519, 1971).

Les cellules sont dissociées mécaniquement et 5 mises en suspension en milieu RPMI 1640 (Tambourin et al, Biomedicine 19, 112, 1983 ; Goldwasser et al, Endocrinology 97, 315, 1975) à la concentration  $1,6 \times 10^6$  cellules/ml contenant 7 % de sérum de veau foetal, 85  $\mu\text{M}$  d'albumine et 0,4  $\mu\text{M}$  de transferrine humaine.

10 Selon les cas un milieu sans sérum est utilisé dans lequel des phospholipides naturels (soja, ovolecithine) purifiés ou synthétiques ( $32 \times 10^{-3}\text{M}$ ) et du cholestérol ( $1,6 \times 10^{-3}\text{M}$ ) sont solubilisés en chloroforme, secondairement évaporé sous courant d'azote. Les lipides en solution 15 d'albumine à 1 mg/ml en RPMI sont dispersés par les ultrasons en glace fondante (Boffa et coll, Exp. Hématol. 10, 675, 1982).

La suspension cellulaire est répartie en volume de 200  $\mu\text{l}$  dans les puits à fond rond des plaques de culture 20 "Nunclon"<sup>M</sup>. Après une incubation de 21 heures à 37°C en présence de 0,7% de CO<sub>2</sub>, la <sup>59</sup>Fe-transferrine est incorporée dans les puits, les plaques sont agitées et remises en incubateur pour une incubation prolongée de 5 heures.

Chaque échantillon est analysé à 3 ou 4 25 concentrations protéiques. L'activité de chaque dose résulte d'une quadruple détermination. Le taux d'incorporation du <sup>59</sup>Fe sur l'hème extrait par la méthyléthylcetone ou dans les cellules est mesuré en fonction du logarithme de la dose de l'échantillon et les résultats sont exprimés en 30 milliunité/ml ou par mg de protéine.

L'étalon est de l'Epo humaine de recombinaison titrant 100.000 U/mg. Son activité spécifique a été définie d'après les échantillons d'Epo humaine issus de la seconde préparation de Référence Internationale (Annable et al, Bull. Wld. Hlth. Org. 47, 99, 1972).

\*Culture de progéniteurs érythroïdes de moelle osseuse ou de sang périphérique.

Les effets de l'Epo HR sur la maturation des BFUe et des CFUe ont été déterminés en culture de précurseurs cellulaires érythroïdes sur méthylcellulose en milieu IMDM dépourvu de sérum (Cormier et al, Cell Differentiation, 17, 5 261, 1985). L'Epo HR, comme l'Epo humaine urinaire, détermine la différentiation et la maturation des BFUe issus de la moelle osseuse de souris ou du sang périphérique humain. L'effet-dose de l'Epo HR sur le développement des CFUe est comparé avec celui donné par l'Epo naturelle.

10 \*Détection par tests radio-immunologiques.

Le dosage radioimmunologique de l'Epo HR a été réalisé dans les surnageants cellulaires selon deux procédés:

. par précipitation par double anticorps en phase soluble :  
15 un immunsérum de lapin anti-Epo urinaire humaine monospécifique (Terry Fox Lab, Vancouver) est incubé avec un étalon d'Epo H ou un échantillon à doser pendant 16 h à 4°C. Après ce délai, 2000 cpm  $^{125}\text{I}$ -Epo HR (Amersham) sont ajoutés et les préparations sont incubées 2 h à 4°C. La dilution de  
20 l'immunsérum choisie est celle qui donne une radioactivité fixée de 20 à 30 %. La dilution finale de l'immunsérum se situe entre  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$ . Après une incubation de 2 h à 20°C avec des immunoglobulines de chèvre anti-Fc de lapin, la radioactivité du culot est mesurée.

25 . par précipitation par double anticorps en phase solide sur Tachisorb<sup>M</sup> :

les réactifs sont répartis en un seul temps sur plaques de microtitration Dynatech<sup>M</sup> 96 puits sous un volume final de 220 $\mu\text{l}$ . Après une incubation de 2 heures sous agitation horizontale rotative à la température ambiante, la récolte s'effectue sur filtre de fibres de verre sur appareil Skatron<sup>M</sup>.

. La distribution concerne successivement l'Epo de la gamme ou de l'échantillon sous un volume de 100  $\mu\text{l}$ ,  
35 l'immun serum anti Epo 10  $\mu\text{l}$ ,  $^{125}\text{I}$ -Epo HR 10  $\mu\text{l}$  et le Tachisorb R 100  $\mu\text{l}$ . Après transfert en tube de polystyrène des échantillons sur fibres de verre, la radioactivité est

mesurée.

La gamme de mesure de la méthode est comprise entre 1 et 100mU.

Les surnageants des cellules transformées possèdent des activités pouvant atteindre 800 U/ml alors que les surnageants cellulaires avec vecteur anti-sens sont dépourvus d'activité. Il y a toujours une excellente corrélation entre les dosages biologiques *in vitro* et le dosage radioimmunologique.

10

2.7. Détection et mesure de l'activité biologique *in vivo* de l'Epo HR

L'activité *in vivo* de l'Epo produite dans les surnageants de culture des cellules lymphoblastoïdes transformées est testée après injection à des souris rendues polyglobuliques par transfusion afin d'inhiber la synthèse d'Epo endogène (Jacobson. et al Proc. Soc. Exp. Biol. Med, 94, 243, 1957). Les résultats indiquent que l'Epo produite par les cellules lymphoblastoïdes présente une puissante activité biologique comparable à celle de l'Epo HR produite par des cellules CHO (Brevet Kirin-Amgen EP 0 148 605).

Les résultats traduisent une étroite corrélation avec les dosages biologiques *in vitro* d'après la seconde préparation de référence internationale d'Epo urinaire humaine.

Exemple 3 : Procédés de préparation de concentrés d'érythropoïétine purifiés à partir du surnageant des cultures de cellules lymphoblastoïdes transformées

30

3.a) Première méthode

Le surnageant de culture cellulaire en milieu pauvre en protéines (CK4) est concentré par ultrafiltration sur membrane PM10 Amicon ou par filtration tangentielle sur Minitan<sup>M</sup> équipé d'une membrane PLGC suivie par un lavage en solution en glucose 12,5 mM, galactose 12,5 mM, PEG 6000 0,1 mg/ml  $\beta$ -mercaptoethanol  $10^{-4}$  M, jusqu'à une résistivité du

filtrat supérieure à 5000 Ohms.

Le concentrat lyophilisé est chromatographié sur Ultrogel<sup>M</sup> AcA44 en tampon acétate de calcium 10 mM, NaCl 100 mM, phénol 5,6 10<sup>-4</sup> M, glucose 12,5 mM, galactose 12,5 mM, PEG 6000 0,1 mg/ml pH 6,8. Les fractions actives sont concentrées par ultrafiltration et lyophilisées. Le produit est ensuite traité par HPLC sur colonne TSK 545 DEAE en tampon acétate 0,048 mM, CaCl<sub>2</sub> 3mM, glucose 12,5 mM, galactose 12,5 mM, PEG-6000 0,1 mg/ml, β-mercaptopropanol 10<sup>-4</sup> M puis élution par un gradient de molarité discontinue de NaCl. Le rendement en activité est voisin de 75- %. Après dialyse et concentration, le produit est chromatographié sur CM Affigel blue<sup>M</sup> en tampon phosphate 10mM, NaCl 150 mM pH 7,2. L'Epo est éluée par une molarité de 1,15 M NaCl. L'activité spécifique de l'Epo HR est supérieure à 100.000 U/mg.

### 3.b) Deuxième méthode

Le concentrat des milieux de culture obtenu sur membranes d'ultrafiltration est traité sur DEAE Séphacel<sup>M</sup> à 4°C en tampon acétate 48 mM, CaCl<sub>2</sub> 3mM, phénol 5,4 10<sup>-4</sup> M, pH 4,5. L'activité retenue est éluée en NaCl 0,6 M.

Après concentration et dialyse, l'éluat est soumis à une filtration sur Ultrogel<sup>M</sup> AcA44, puis la fraction active détectée par RIA est chromatographiée en HPLC-DEAE en présence de réducteurs et d'hexoses stabilisants. L'Epo HR éluée en tampon pH 5,5; à faible molarité de NaCl, est concentrée sur membrane Amicon<sup>M</sup> PM10 puis chargée sur une colonne de WGA-Sépharose 6MB en tampon PBS à 4°C. Son élution est obtenue par N-acetylglucosamine 0,5 M.

En électrophorèse sur gel en gradient de polyacrylamide (4 à 30 %) en présence de SDS, un composant de 34 kDa est observé dans les préparations issues du WGA-Sépharose. Ce composant est identifié en "immunoblot" par des immunoglobulines-polyclonales anti-Epo HR et des anticorps monoclonaux anti-Epo HR. Un composant minoritaire migrant sur une zone de 42 kDa est observé dans certaines préparations. Ce composant

n'est pas reconnu en immunoblots par des immuns sérums polyclonaux anti-Epo HR. Ce résultat est confirmé par la détection radioimmunologique et par l'analyse en culture d'érythroblastes de foie foetal de souris des éluats 5 d'électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide SDS. Selon les cas, une étape de purification complémentaire est réalisée soit sur CM Affigel blue<sup>M</sup>, soit sur HA-Ultrogel<sup>M</sup> ou en HPLC filtration en milieu SDS 0,1 %. Le poids moléculaire apparent de l'Epo HR en gel de polyacrylamide/SDS est de 34 10 kDa.

L'activité spécifique obtenue est supérieure à 120.000 U/mg en culture d'érythroblastes et en RIA avec des rendements compris entre 20 et 30 %.

15 3.c) Troisième méthode : Immunopurification de l'Epo HR

\*c-1. Préparation de l'immunoadsorbant

A partir de surnageants cellulaires la préparation d'Epo HR purifiée a été réalisée d'après la méthode décrite dans le deuxième exemple ci-dessus. L'activité spécifique de 20 cette préparation déterminée par dosage radioimmunologique et par son activité en culture d'érythroblastes était de 130.000 U.I.

l'Epo HR lyophilisée puis reprise en solution en présence de SDS à 0,05 % a servi à l'immunisation de souris 25 Balb/c.

Chaque souris a reçu à 15 jours d'intervalle trois injections intrapéritonéales aux doses suivantes : 90, 45 et 10 ou 35 µg pour la dernière injection. Toutes les fusions ont été réalisées 5 jours après la dernière injection.

30 Selon les expériences 30 à 90 % des puits de fusion ont été testés. Les anticorps sont recherchés dans les surnageants des puits de fusion d'après leur capacité de fixer <sup>125</sup>I-Epo HR. L'identification des complexes marqués est obtenue par un anticorps de chèvre anti-IgG de souris 35 fixé par liaison covalente sur protéine A de staphylocoques. Les complexes sont collectés et comptés.

Au cours de la 10ème fusion, 3 hybrides se sont

révélés positifs et ont été clonés. Le sérum de la souris qui a fourni les splénocytes présentait une réactivité immunologique de 65 % avec une dilution au 1/3000. Un anticorps monoclonal anti-Epo de référence : Ep10-141A26 de classe IgG a été obtenu. Son taux de fixation est compris entre 50 et 60 %. Le clone producteur de l'anticorps s'est avéré stable après de multiples clonages et sous clonages.

Une expansion réalisée en culture et en ascite a permis d'obtenir des volumes suffisants pour la purification de plusieurs dizaines de milligrammes d'anticorps. La purification des anticorps est réalisée sur protéine G-Sépharose. L'anticorps purifié est obtenu par adsorption de l'ascite en tampon phosphate 0,1 M, pH 7,5, lavage à pH 6,5 et élution en tampon glycine-HCl 0,1 M, pH 2,8. Des lots de 30 mg d'anticorps Ep10-141A26 purifié sont obtenus et fixés sur Sépharose 4B activité (8ml de gel) par le bromure de cyanogène. A titre d'exemple une telle colonne peut fixer environ 5 à 6 mg d'Epo HR. Des essais préliminaires ont montré que l'Epo était adsorbée par l'anticorps immobilisé à un pH voisin de la neutralité. Son élution a été analysée à différents pH : 6,5, 4,5, 2,8 et 2,2 ; elle s'effectue principalement à partir de pH 4,5 jusqu'à 2,8.

La conservation de l'immunoadsorbant est effectuée en tampon phosphate pH 7,5, Thymirosal<sup>M</sup> 0,02 % à 4°C ; la colonne peut être utilisée pour de nombreux cycles.

#### \*c-2. Purification de l'Epo

La purification est réalisée en deux étapes :

- Première étape :

Le surnageant de cellules lymphoblastoïdes est amené par ultrafiltration à une concentration protéique de 3 à 4 mg/ml, puis dialysé en eau déminéralisée et équilibré avec l'acide acétique à pH 4,5 et à 1.000 Ohms par addition d'eau.

Après élimination d'un précipité par centrifugation le produit est traité sur colonne de DEAE Séphacel<sup>M</sup>, équilibré en tampon acétate 0,04 M, CaCl<sub>2</sub> 0,0025

M et phénol  $5,4 \cdot 10^{-4}$  M, avec un rapport égal à 0,1 (volume d'échangeur en ml/protéines incorporées en mg).

L'élution de la fraction active obtenue par addition de 0,6 M NaCl dans le tampon de départ représente 15 à 20 % des protéines incorporées. Les produits élués sont équilibrés à pH 7 puis dialysés jusqu'à une résistivité de 80 à 100 Ohms.

- Deuxième étape :

Elle est réalisée sur l'immunoadsorbant préparé selon la méthode décrite ci-dessus. Les protéines éluées de la DEAE Séphacel<sup>M</sup> sont incorporées sur l'immunoadsorbant en tampon phosphate 0,1 M pH 7,5 à 4°C avec un débit de 6 à 7 ml/heure. Le lavage est effectué à pH 6,5 dans le même tampon. L'élution de l'Epo a été obtenue par un tampon glycine 0,1 M HCl pH 2,2 avec un débit de 50 ml/heure à la température ambiante. L'éluat est équilibré par du tampon tris 1 M, pH 7,5. Le rendement en activité se situe entre 50 et 60 % de l'Epo active de départ.

\*c-3. Caractéristiques de l'Epo HR immunopurifiée à partir des produits des cellules lymphoblastoïdes.

Le degré d'homogénéité des préparations d'Epo HR est apprécié par densitométrie après électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS. L'Epo est homogène à plus de 98 %.

Le poids moléculaire apparent mesuré par électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS est de 34.000 daltons. Son comportement électrophorétique est identique à celui de l'Epo produite par des cellules CHO ainsi qu'à celui de la molécule radioiodée (commercialisée par Amersham). Son point isoélectrique est compris entre 3,5 et 4. Son activité spécifique est supérieure aux préparations d'Epo urinaire et se situe selon les lots aux environs de 200.000 UI/mg.

Exemple 4 : Utilisation du plasmide vecteur intégratif pour produire l'Interleukine-3 humaine dans les cellules lymphoblastoïdes.

Une sonde constituée de l'oligonucléotide complémentaire inverse (30-mer) d'une séquence de l'IL-3 :

5'TAA GTG TGT TAT AAT TTC ATC GAT CAT GTT 3'

a été utilisée pour cribler une banque d'ADN génomique de leucocytes humains et une banque d'ADNc de foie foetal humain. La sonde synthétisée correspond à la base 110 (et suivantes) en aval de l'ATG initiateur de la séquence codante ADNc de l'IL-3.

Plusieurs clones ont été isolés et la présence du gène a été confirmée par cartographie de restriction. Les phages contenant ces gènes sont sous-clonés dans pUC 18 sous forme de fragment Acc I de 5,4 Kb. Avant d'introduire ce fragment dans la cassette d'expression du plasmide vecteur, les séquences promoteur et 3' non traduite en sont éliminées. Pour cela, la région contenant la séquence codante est amplifiée par la méthode PCR à l'aide des 2 oligonucléotides de synthèse suivants :

INTS 16 : 5' GATCCAAACATGAGCCGCCT 3'  
début : position -9 de l'ATG (Met initiatrice)  
INTS 17 : 5' ATGTCCCGAGGGCGCTGTGGT 3'  
début : position 52 en aval du codon stop  
en utilisant comme matrice les clones génomiques dans pUC18,  
caractérisés précédemment.

Le produit d'amplification de 2.140 pb est sous-cloné dans le site Sma I d'un pUC18 et partiellement séquencé pour vérifier l'intégrité du gène IL-3 (selon Yang et Clark, dans "Developmental Control of globin gene expression" A.R. Liss p.3-11 1987).

La séquence codante ainsi contrôlée a été introduite dans la cassette d'expression du plasmide vecteur décrit dans l'exemple 1. Un clone cellulaire transformé donnant une réponse bien positive a été sélectionné et multiplié.

De l'interleukine-3 biologiquement active est sécrétée dans le milieu de culture des cellules.

Exemple 5 : Utilisation du plasmide vecteur intégratif pour produire du GM-CSF humain dans les cellules lymphoblastoïdes.

Une sonde constituée de l'oligonucléotide

complémentaire inverse (30 mer) d'une séquence du GM-CSF :

5' TTG CTC TAA GCA CTT GAG CAG GAA GCT CTG 3'

a été utilisée pour cribler une banque d'ADN génomique de leucocytes humains et une banque d'ADNc de foie foetal 5 humain. La sonde synthétisée correspond à la base 157 (et suivantes) en aval de l'ATG initiateur de la séquence codante du GM-CSF.

Plusieurs clones ont été isolés et la présence du gène a été confirmée par cartographie de restriction. Les 10 phages contenant ces gènes sont sous-clonés dans pUC18 sous forme de fragment Hind III/Eco RI de 3,2 Kb. Avant d'introduire ce fragment dans la cassette d'expression du plasmide vecteur, les séquences promoteur et 3' non traduite en sont éliminées. Pour cela, la région contenant la 15 séquence codante est amplifiée par la méthode PCR à l'aide des 2 oligonucléotides de synthèse suivants :

INTS 19 : 5'CACAGAGAGAAAGGCTAAAG 3'

début : position-31 de l'ATG (Met initiatrice)

INTS 18 : 5' ATTCCCATTCTTCTGCCATG 3'

20 début : position 177 en aval du codon stop en utilisant comme matrice les clones génomiques dans pUC18, caractérisés précédemment.

Le produit d'amplification de 2.240 pb est sous-cloné dans le site Sma I d'un pUC18 et partiellement 25 séquencé pour vérifier l'intégrité du gène GM-CSF (selon Miyatake et al. EMBO J.4, 2561, 1985).

La séquence codante ainsi contrôlée a été introduite dans la cassette d'expression du plasmide vecteur décrit dans l'exemple 1. Un clone cellulaire transformé 30 donnant une réponse bien positive a été sélectionné et multiplié.

Du GM-CSF biologiquement actif est sécrété dans le milieu de cultures des cellules.

## REVENDICATIONS

1.- Utilisation de lignées de cellules lymphoblastoides humaines, immortalisées in vitro par le virus d'Epstein-Barr (EBV) et sélectionnées pour leur absence de caractère tumoral ou tumorigène, pour la production à l'échelle industrielle de protéines hétérologues codées par un segment d'ADN inséré dans un plasmide vecteur génétiquement manipulé, de type intégratif et portant une cassette d'expression comprenant tous les éléments permettant l'expression desdites protéines hétérologues dans lesdites cellules lymphoblastoides après intégration de ladite cassette d'expression dans l'ADN chromosomique cellulaire.

2.- Plasmide vecteur destiné à l'utilisation des cellules lymphoblastoides pour la production de protéines hétérologues selon la revendication 1, comportant les éléments d'ADN bactérien nécessaires à son amplification dans un hôte bactérien de type E.coli, caractérisé en ce qu'il comporte simultanément :

- a) les éléments d'ADN constituant une cassette d'expression d'un ADN hétérologue, ladite cassette étant conçue en vue de son utilisation dans les cellules lymphoblastoides humaines,
- b) la séquence d'ADN de l'Adenovirus 5 codant pour les ARN VAI et VAI, pour optimiser la traduction des ARN messagers,
- c) un gène de sélection manipulé pour être efficace dans les cellules eucaryotes,
- d) des éléments d'ADN sélectionnés pour favoriser l'intégration de l'ADN plasmidique dans l'ADN chromosomique cellulaire.

3.- Eléments d'ADN constituant une cassette d'expression incluse dans le plasmide vecteur selon la revendication 2 a), caractérisée en ce qu'elle comprend :  
a) une séquence activatrice de transcription dérivée d'un Adenovirus,

- b) un promoteur et une séquence "leader" dérivés d'un Adenovirus,
- c) un oligonucléotide de synthèse contenant des sites de restriction destinés à l'insertion de la séquence d'ADN codant pour une protéine hétérologue choisie,
- 5 d) un signal de polyadénylation dérivé du virus SV 40.

4.- Cassette d'expression selon la revendication 3, caractérisée en ce que :

- l'élément a) est la séquence activatrice du gène EIA de l'Adenovirus 5 humain ;
- l'élément b) est le promoteur majeur tardif de l'Adenovirus 2 humain associé à la séquence "leader" tripartite du même Adenovirus 2 ;
- l'élément c) a été conçu pour offrir des sites de restriction rares pour favoriser la manipulation d'insertion de la séquence d'ADN hétérologue.

5.- Oligonucléotide inclus dans une cassette d'expression selon la revendication 3 c) ou 4, caractérisé en ce qu'il offre les sites de restriction Not I, Bst EII, Bgl II, MLu I.

6.- Gène de sélection inclus dans le plasmide vecteur selon la revendication 2 c) caractérisé en ce qu'il est choisi parmi - l'ADN codant pour la xanthine-guanine phosphoribosyl transférase (XGPRT) de E-coli placé sous le contrôle du promoteur et des signaux de maturation du gène Tk du virus HSV1,

- l'ADNc de la dihydrofolate réductase (DHFR) de souris
- ou la combinaison des deux, insérés à des points distincts du plasmide vecteur.

30 7.- Eléments d'ADN inclus dans le plasmide vecteur selon la revendication 2 d), caractérisés en ce qu'ils comprennent un fragment d'ADN mitochondrial de souris.

35 8.- ADN hétérologue inclus dans la cassette d'expression selon la revendication 3 c), caractérisé en ce qu'il est constitué de la séquence codante d'une protéine choisie parmi les protéines d'intérêt thérapeutique

difficiles à purifier à partir d'une source naturelle.

9.- ADN selon la revendication 8, constitué de la séquence codante de l'érythropoïétine ou d'une protéine ayant l'activité de l'érythropoïétine.

5 10.- ADN selon la revendication 8, constitué de la séquence codante de l'interleukine 3 ou d'une protéine ayant l'activité de l'interleukine 3.

11.- ADN selon la revendication 8, constitué de la séquence codante du GM-CSF.

10 12.- Lignées cellulaires lymphoblastoïdes humaines immortalisées par l'EBV pour l'utilisation selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'elles sont transformées de manière stable par les éléments d'ADN d'un plasmide vecteur selon la revendication 2.

15 13.- Lignées cellulaires selon la revendication 12, caractérisées en ce qu'elles sont clonées et sélectionnées par criblage pour leur taux élevé de sécrétion de la protéine hétérologue choisie.

14.- Lignées cellulaires selon la revendication 20 12 ou 13, caractérisées en ce que la lignée de départ réceptrice du plasmide vecteur est la lignée déposée à l'ATCC sous la référence CCL 156 RPMI 1788.

15.- Lignées cellulaires selon la revendication 25 12 ou 13, caractérisées en ce que la lignée de départ réceptrice du plasmide vecteur est une lignée dérivée de lymphocytes B d'un donneur sain, par immortalisation par l'EBV.

1/2

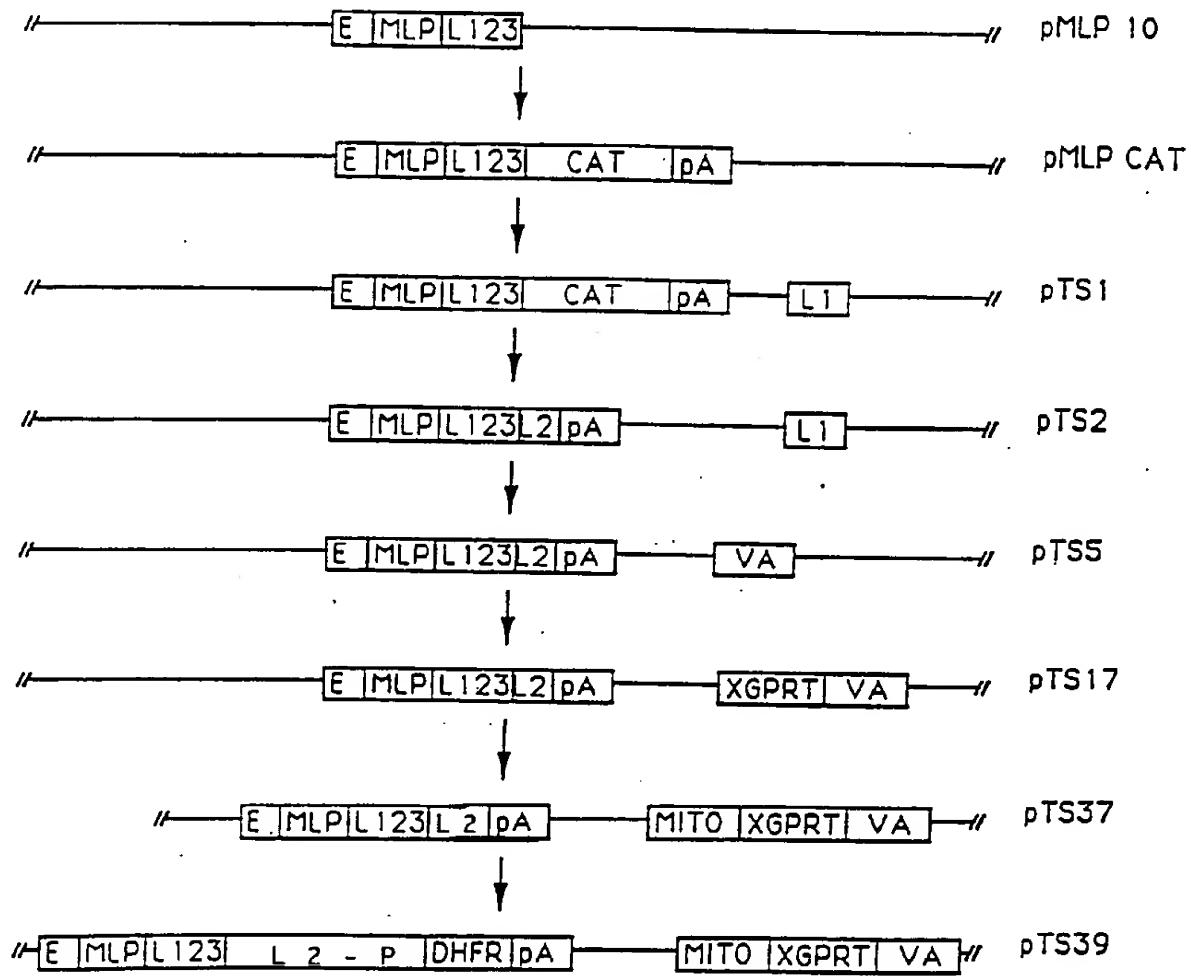


FIGURE 1

2/2

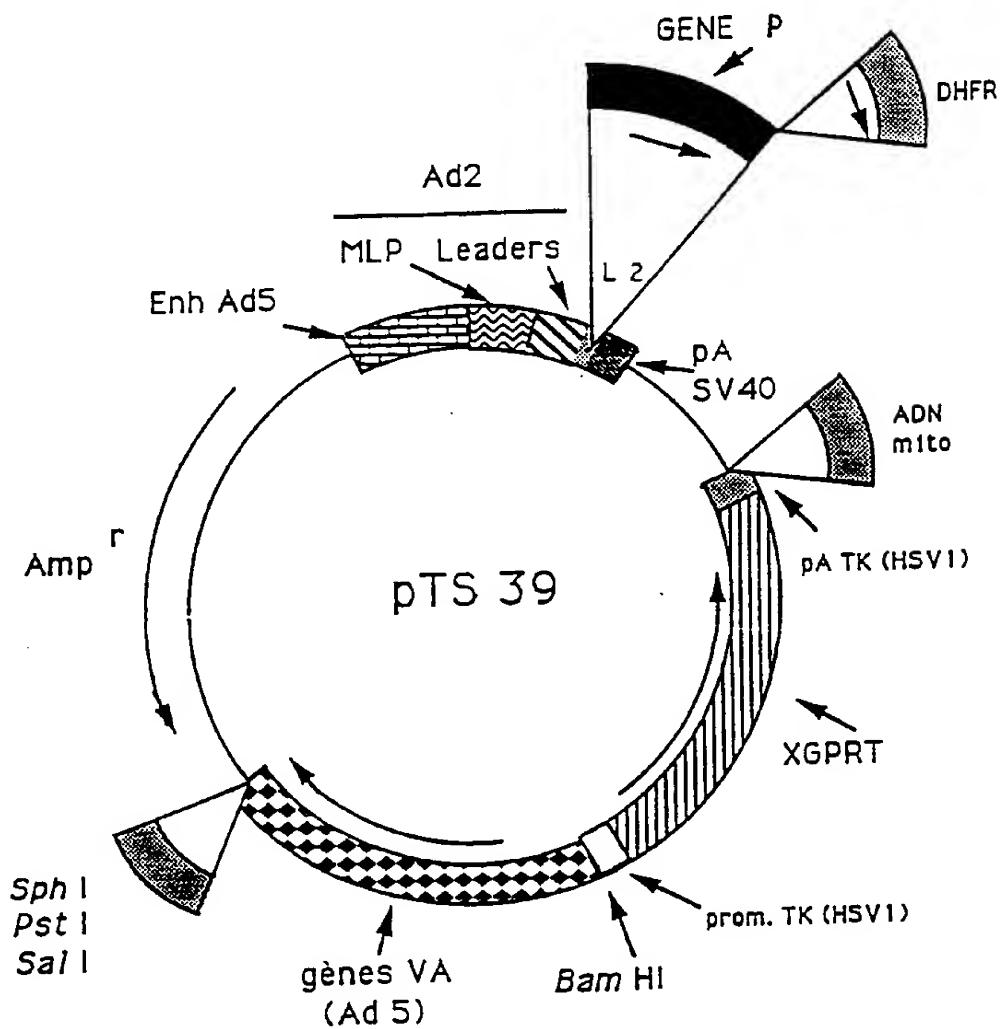


FIGURE 2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 91/00636

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.5 C12N15/86; C12N5/10; C12N15/24; C12N15/27 C12N15/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.5 C12N; C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GENE vol. 101, No.2, 30 May 1991, AMSTERDAM NL pages 195-202; LEVRERO, M. ET AL.: 'Defective and non defective adenovirus vectors for expressing foreign genes in vitro and in vivo' see figures 1-3; table I see the whole document	1
Y		2-4, 8
Y	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 83, No. 13, 1986, WASHINGTON US pages 4690 - 4694; SVENSSON, C. ET AL.: 'Defective RNA splicing in the absence of adenovirus-associated RNAI' see the whole document	2-4, 8
		-/-

<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"B" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 26 March 1992 (26.03.92)	Date of mailing of the international search report 3 April 1992 (03.04.92)
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 91/00636

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 103, 1985, Columbus, Ohio, US; abstract No. 136210, page 205; column 1; see abstract & EMBO JOURNAL. vol. 4, No. 4, 1985, EYNSHAM, OXFORD GB pages 957 - 964; SVENSSON, C. ET AL.: 'Adenovirus VA RNA I mediates a translational stimulation which is not restricted to the viral mRNAs' cited in the application	2-4, 8
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 103, 1985, Columbus, Ohio, US; abstract No. 48859J, page 117 ; column 1 ; see abstract & SOMATIC CELL MOL. GENET. vol 11, No. 3, 1985, pages 223 - 238; LUTFALLA, G. ET AL.: 'Shuttling of integrated vectors from mammalian cells to E. coli is mediated by head-to-tail multimeric inserts' cited in the application	7
X	BIOTECHNOLOGY vol. 8, No. 6, June 1990, NEW YORK US pages 550 - 553; OKAMOTO, M. ET AL.: 'Amplification and high-level expression of a cDNA for human Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating Factor in human lymphoblastoid namalwa cells' see the whole document	8,11
X	WO,A,8 804 691 (GIST-BROCADES N.V.) 30 June 1988 see the whole document	8,10
X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 78, No. 4, April 1981, WASHINGTON US pages 2072 - 2076; MULLIGAN, R.C. & BERG, P.: 'Selection for animal cells that express the Escherichia coli gene coding for xanthine-guanine phosphoribosyltransferase' cited in the application see the whole document	6
		-/—

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 91/00636

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>GENE vol. 76, 1989, AMSTERDAM NL pages 19 - 26; YANAGI, H. ET AL.: 'Expression of human erythropoietin cDNA in human lymphoblastoid Namalwa cells: the inconsistency of a stable expression level with transient expression efficiency' cited in the application see the whole document</p> <p>---</p>	8,9

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9100636  
SA 50224

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 31/03/92. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A- 8804691	30-06-88	AU-A-	1057788	15-07-88

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 91/00636

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>7</sup>

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

CIB 5 C12N15/86; C12N5/10; C12N15/24;

C12N15/16

C12N15/27

## II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée<sup>8</sup>

Système de classification	Symboles de classification	
CIB 5	C12N ;	C07K
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté <sup>9</sup>		

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS<sup>10</sup>

Catégorie <sup>11</sup>	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, <sup>12</sup> des passages pertinents <sup>13</sup>	No. des revendications visées <sup>14</sup>
X	GENE. vol. 101, no. 2, 30 Mai 1991, AMSTERDAM NL pages 195 - 202; LEVRERO, M. ET AL.: 'Defective and non defective adenovirus vectors for expressing foreign genes in vitro and in vivo' voir figures 1-3; tableau I voir le document en entier ---	1
Y	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 83, no. 13, 1986, WASHINGTON US pages 4690 - 4694; SVENSSON, C. ET AL.: 'Defective RNA splicing in the absence of adenovirus-associated RNAI' voir le document en entier ---	2-4, 8
Y	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 83, no. 13, 1986, WASHINGTON US pages 4690 - 4694; SVENSSON, C. ET AL.: 'Defective RNA splicing in the absence of adenovirus-associated RNAI' voir le document en entier ---	2-4, 8
		-/-

<sup>11</sup> Catégories spéciales de documents cités:<sup>11</sup>

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant poser un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.

"R" document qui fait partie de la même famille de brevets

## IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

1

26 MARS 1992

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

03.04.92

Administration chargée de la recherche internationale

OFFICE EUROPÉEN DES BREVETS

Signature du fonctionnaire autorisé

CHAMBONNET F.J.

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS <sup>14</sup>		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie <sup>15</sup>		No. des revendications visées <sup>18</sup>
Y	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 103, 1985, Columbus, Ohio, US; abstract no. 136210, page 205 ; colonne 1 ; voir abrégé &amp; EMBO JOURNAL. vol. 4, no. 4, 1985, EYNSHAM, OXFORD GB pages 957 - 964; SVENSSON, C. ET AL.: 'Adenovirus VA RNA mediates a translational stimulation which is not restricted to the viral mRNAs' cité dans la demande ---</p>	2-4, 8
X	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 103, 1985, Columbus, Ohio, US; abstract no. 48859J, page 117 ; colonne 1 ; voir abrégé &amp; SOMATIC CELL MOL. GENET. vol. 11, no. 3, 1985, pages 223 - 238; LUTFALLA, G. ET AL.: 'Shuttling of integrated vectors from mammalian cells to E. coli is mediated by head-to-tail multimeric inserts' cité dans la demande ---</p>	7
X	<p>BIOTECHNOLOGY vol. 8, no. 6, Juin 1990, NEW YORK US pages 550 - 553; OKAMOTO, M. ET AL.: 'Amplification and high-level expression of a cDNA for human Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating Factor in human lymphoblastoid namalwa cells' voir le document en entier ---</p>	8, 11
X	<p>WO,A,8 804 691 (GIST-BROCADES N.V.) 30 Juin 1988 voir le document en entier ---</p>	8, 10
X	<p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 78, no. 4, Avril 1981, WASHINGTON US pages 2072 - 2076; MULLIGAN, R.C. &amp; BERG, P.: 'Selection for animal cells that express the Escherichia coli gene coding for xanthine-guanine phosphoribosyltransferase' cité dans la demande voir le document en entier ---</p>	6

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS <sup>14</sup>		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie <sup>o</sup>		No. des revendications visées <sup>18</sup>
X	<p>GENE  vol. 76, 1989, AMSTERDAM NL  pages 19 - 26;  YANAGI, H. ET AL.: 'Expression of human erythropoietin cDNA in human lymphoblastoid Namalwa cells: the inconsistency of a stable expression level with transient expression efficiency'  cité dans la demande  voir le document en entier</p> <p>----</p>	8,9

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE  
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.

FR 9100636  
SA 50224

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.  
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 26/03/92.  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-8804691	30-06-88	AU-A- 1057788 EP-A- 0275598 JP-T- 1502157	15-07-88 27-07-88 03-08-89

EPO FORM P0472

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82